

METHOD OF DETERMINING LIPASE ACTIVITY USING A TRIGLYCERIDE REAGENT AND METHOD FOR PREPARING THAT REAGENTPatent Number: ☐ GB1530238

Publication date: 1978-10-25

Inventor(s):

Applicant(s): DU PONT

Requested
Patent:☐ FR2350604Application
Number:

GB19770015859 19770415

Priority Number
(s):

US19760682977 19760504

IPC

Classification: G01N31/14

EC

Classification: C12Q1/44

Equivalents:

☐ BE854219, CA1109373, ☐ CH628929, ☐ DE2719704, DK194577, ☐ IE44834,
☐ IT1114613, ☐ JP52134499, ☐ LU77256, ☐ NL7704782**Abstract**

The reagent for the determination of lipase activity in a solution consists of a solid matrix of an inert carrier which is soluble in an aqueous reaction solution and is impregnated with a triglyceride. The carrier is preferably impregnated with triolein; the carrier is, for example, a sugar. To prepare the reagent, at least one triglyceride is dissolved in a solvent. The resulting solution is then mixed with an appropriate amount of the inert carrier which is soluble in an aqueous reaction solution. Finally, the solvent is evaporated off so that a solid matrix of the carrier impregnated with the triglyceride remains. The lipase activity in a sample is determined by reacting the sample with an emulsion of a triglyceride in an aqueous reaction solution and measuring the rate at which the triglyceride is hydrolysed to soluble fragments.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 77 13341

(54)

Procédé pour déterminer l'activité de la lipase en utilisant un nouveau réactif triglycéride et procédé pour préparer ce réactif.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.²). G 01 N 33/16, 21/02, 31/22.

(22)

Date de dépôt 3 mai 1977, à 15 h.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée aux Etats-Unis d'Amérique le 4 mai 1976, n. 682.977 aux noms de Earl Browning Huntley et Warren Keene Miller.*

(41)

Date de la mise à la disposition du public de la demande

B.O.P.I. — «Listes» n. 48 du 2-12-1977.

(71)

Déposant : Société dite : E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY, résidant aux Etats-Unis d'Amérique.

(72)

Invention de :

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet L. A. de Boisse.

La présente invention concerne un procédé pour déterminer l'activité de la lipase d'un échantillon en faisant réagir l'échantillon avec une émulsion de triglycéride et un procédé pour préparer le réactif triglycéride utilisé pour former
5 l'émulsion.

La lipase est un enzyme produit par le pancréas. L'activité lipolytique dans le sang ou le sérum sanguin est accrue par la pancréatite et d'autres maladies du pancréas. Une mesure de l'activité de la lipase dans le sang ou le sérum
10 sanguin est donc un outil utile de diagnostic pour les médecins.

Un procédé usuel pour déterminer l'activité de la lipase est le procédé turbidimétrique décrit par Shihabi et Bishop dans Clinical Chemistry, 17, pages 1150-1153 (1971), dans lequel une relation est établie entre la diminution du facteur
15 d'absorption d'une émulsion huile d'olive/eau et l'activité de la lipase. L'huile d'olive est un mélange de substances que l'on appelle collectivement triglycéride. Quand il est mélangé en solution aqueuse, le triglycéride forme une émulsion. La lumière incidente à cette émulsion est diffusée par les gouttelettes
20 d'huile de sorte que très peu de lumière se transmet à travers l'émulsion. La lipase hydrolyse le triglycéride en fragments qui sont solubles dans le mélange réactionnel. A mesure que le triglycéride est hydrolysé, la diffusion de la lumière par l'émulsion est réduite et la transmission de la lumière à
25 travers le milieu est accrue.

On pense couramment que la lipase attaque le triglycéride à l'interface liquide-huile, de sorte que l'état émulsionné du triglycéride est important pour la réaction. Il est si important que les techniques courantes de formation de l'émulsion de
30 triglycéride sont insuffisantes. Les émulsions de triglycéride formées dans un homogénéiseur, tel qu'un mélangeur, ou par un mélange de solvant et de liquide aqueux, présentent une stabilité limitée (quatre à huit semaines). De plus, elles sont difficiles à préparer et en général manquent de reproductibilité. Ces deux
35 insuffisances limitent l'utilité de ce procédé dans des analyseurs automatisés.

La présente invention fournit un procédé pour déterminer l'activité de la lipase d'un échantillon en faisant réagir l'échantillon avec une émulsion d'un triglycéride dans une
40 solution aqueuse de réaction et en mesurant la vitesse à laquelle

le triglycéride est hydrolysé en fragments solubles. On forme l'émulsion en utilisant comme réactif triglycéride une matrice solide d'un excipient uniformément imprégnée du triglycéride, l'excipient étant soluble dans la solution aqueuse de réaction, 5 et en dissolvant la matrice solide pour libérer le triglycéride, sous la forme d'une émulsion, dans la solution aqueuse de réaction.

Dans le mode de mise en oeuvre préféré du procédé, l'excipient comprend du polyéthylène-glycol et un sucre ou un 10 alcool de sucre comme du mannitol, de l'inositol, du sorbitol, du maltose, du dextrose, du lactose, du dextrane et des mélanges de ceux-ci; et il est imprégné de trioléine, l'un des principaux triglycérides.

L'invention fournit aussi un procédé pour préparer un 15 réactif utilisable conjointement avec une solution aqueuse de réaction pour déterminer l'activité de la lipase d'un échantillon, comprenant les étapes qui consistent à :

(a) former une solution liquide d'au moins un triglycéride (par exemple de la trioléine) avec un solvant pour ce 20 triglycéride;

(b) mélanger la solution liquide avec une quantité prédéterminée d'un excipient qui est soluble dans la solution aqueuse de réaction, le volume de solvant utilisé pour former la solution liquide étant choisi de manière à substantiellement 25 saturer l'excipient; et

(c) évaporer le solvant de manière à laisser une matrice solide de l'excipient imprégné du triglycéride, la quantité de triglycéride utilisée pour former la solution liquide étant choisie de manière à donner la concentration désirée de triglycé- 30 ride par rapport au poids de matrice solide.

La première étape dans le procédé de préparation du réactif triglycéride utilisable pour déterminer l'activité de la lipase d'un échantillon, en particulier d'un échantillon de sang ou de sérum sanguin, consiste à dissoudre le triglycéride 35 dans un solvant approprié. Le triglycéride est un substrat pour la lipase. Dans le passé, on a utilisé de l'huile d'olive purifiée ou de la trioléine, l'un des triglycérides majeurs. Pour plus de commodité, la discussion ci-après sera limitée au cas de la trioléine, mais la lipase réagira avec n'importe 40 quel triglycéride et ainsi on peut utiliser dans la présente

invention n'importe quel triglycéride ou n'importe quelle combinaison de triglycérides.

Le solvant utilisé pour dissoudre le triglycéride dépendra évidemment du triglycéride choisi. De nombreux solvants pour triglycéride sont connus de l'homme de l'art. Les solvants utilisés pour former le réactif triglycéride selon la présente invention doivent satisfaire à quatre critères. Il doit dissoudre le triglycéride particulier utilisé. Il ne doit pas dissoudre l'excipient particulier choisi. Il doit s'évaporer dans des conditions qui ne seront pas nuisibles pour le triglycéride ou l'excipient. Enfin, il ne doit pas laisser de résidu ou, au moins, il ne doit laisser qu'un résidu inerte, c'est-à-dire un résidu qui ne réagit pas avec l'autre réactif utilisé et n'est pas nuisible pour ce dernier.

Des solvants comme le chloroforme et l'éthanol dissoudront la trioléine. On a trouvé que le chloroforme ou l'éthanol ou des mélanges de chloroforme, de préférence des mélanges contenant jusqu'à environ 50% d'éthanol, produiront une solution uniforme de trioléine.

Le volume de solvant utilisé pour dissoudre le triglycéride est choisi de manière que, quand la solution liquide de triglycéride est appliquée à l'excipient, le liquide sature juste la matière solide. Si on utilise trop peu de solvant, il se produira une distribution non-uniforme du solvant et, donc, du triglycéride dans toute la matière solide. Quand la poudre est divisée, cela produit des portions de réactif ayant des teneurs variables en triglycéride. Si on utilise trop de solvant, la totalité de la solution, et en particulier le triglycéride qu'elle contient, n'imprègnera pas la matière solide. Si la matière solide est mise à égoutter avant l'étape de séchage, cela conduira à une perte d'un peu du triglycéride; sinon, la portion du triglycéride contenue dans la solution qui n'imprègne pas la matière solide revêtira la matière solide d'une manière non-uniforme. Suivant la précision requise, chacune de ces conditions peut être tolérée, mais pour les meilleurs résultats la quantité de solvant utilisée doit être choisie de manière que la solution de triglycéride sature sensiblement la matière solide.

La quantité de triglycéride utilisée dans la solution est une question de choix. La quantité utilisée doit être choisie de manière à donner la concentration désirée de tri-

glycéride pour un volume donné de la matrice solide formée quand le solvant est évaporé.

Par définition, un excipient est une substance inerte qui forme un véhicule pour un réactif particulier, dans ce cas le triglycéride. L'excipient choisi pour former la matrice solide selon la présente invention doit satisfaire à trois critères. Il ne doit pas se dissoudre dans le solvant choisi pour dissoudre le triglycéride. Il doit se dissoudre dans le milieu dans lequel a lieu le titrage de la lipase. Cette dissolution est nécessaire pour libérer le triglycéride dans la solution de réaction afin de former l'émulsion. La solution de réaction est normalement une solution aqueuse qui est maintenue à un pH compris entre 8,5 environ et 9,5 environ. Enfin, l'excipient doit être inerte et non-déTECTABLE dans l'essai. Il existe de nombreuses matières connues de l'homme de l'art qui remplissent les conditions pour être utilisées comme excipients dans la présente invention. Des matières courantes parmi elles sont des sucres et des alcools de sucres, comme le mannitol, l'inositol, le sorbitol, le maltose, le dextrose, le lactose, le dextrane, et les mélanges de ceux-ci.

Une distribution plus uniforme du triglycéride dans la matrice solide sera formée si, en plus des substances mentionnées ci-dessus, on utilise du polyéthylène-glycol. Le produit Carbowax[®] 6000 est une substance appropriée. Cette substance empêche l'agglomération des gouttelettes de triglycéride dans la matrice solide et aide à produire un revêtement uniforme de la solution de triglycéride sur la surface de la matrice solide. Le polyéthylène-glycol, toutefois, n'est pas absolument nécessaire.

Une fois que le triglycéride et le solvant pour le triglycéride ont été choisis et mélangés pour former la solution désirée, la solution de triglycéride et l'excipient sont mélangés ensemble. Cela peut s'effectuer d'un certain nombre de manières connues de l'homme de l'art. En particulier, on peut utiliser un mélangeur mécanique Hobart[®]. On continue l'opération de mélange jusqu'à ce que l'excipient soit juste saturé. L'excipient saturé est ensuite séché pour évaporer le solvant utilisé pour dissoudre le triglycéride et une matrice solide uniformément imprégnée du triglycéride est formée. Le séchage peut être effectué d'un certain nombre de manières bien connues de l'homme de l'art. En particulier, un séchage à l'air dans une hotte peut être utilisé. La matrice solide imprégnée peut être utilisée sous la forme d'une

poudre ou elle peut être mise sous la forme de comprimés en utilisant des techniques classiques de formation de comprimés.

Comme exemple particulier de la formation de la matrice imprégnée de triglycéride, on mélange ensemble 94 parties de mannitol et 5 parties de Carbowax[®] 6000 pour former un excipient. On dissout 1 partie de trioléine dans un mélange de 50% de chloroforme et de 50% d'éthanol, la quantité de solvant étant choisie de manière que lors du mélange avec l'excipient, il se forme un mélange de matière solide juste saturée. Le mélange de solvants contenant la trioléine est ensuite ajouté au mélange mannitol-Carbowax[®] 6000 dans un mélangeur mécanique Hobart[®] et mélangé pendant 30 minutes. L'excipient saturé ainsi formé est ensuite séché pendant 60 minutes, ou jusqu'à ce que le solvant soit complètement évaporé, dans une hotte. Une matrice solide uniformément imprégnée de trioléine est formée. Cette matrice solide est sous la forme de poudre. Le mélange imprégné est ensuite mis sous la forme de comprimés, pour donner des comprimés d'environ 85 mg contenant environ 0,87 mg de trioléine pour chaque comprimé.

Un essai pour déterminer l'activité de la lipase dans du sérum humain est ensuite effectué par une technique turbidimétrique cinétique dans laquelle la vitesse de "clarification" de l'émulsion de trioléine est contrôlée à 340 nm. Cette vitesse est proportionnelle à l'activité de la lipase de l'échantillon. On utilise du chlorure de calcium et des sels biliaires comme activateurs pour la lipase. On tamponne aussi le système en utilisant du tampon tris(hydroxyméthyl) aminométhane ("Tris") qui sert d'agent de réglage du pH (pH de 8,6 à 9,0) pour la solution aqueuse de réaction. La réaction se produit comme suit :

30	Emulsion de trioléine (trouble)	$\xrightarrow[\text{pH } 8,8 \text{ (25°C)}]{\text{Ca}^{++}, \text{ Lipase}}$	Acide gras libres + glycérides mélangés (turbidité décroissante)
----	------------------------------------	---	--

Comme exemple particulier d'un dosage de lipase, on prépare un ensemble de dosage contenant les réactifs suivants :

35 Tampon Tris, pH 8,8 \pm 0,2; 50 μ moles
 Désoxycholate 35,5 μ moles
 Chlorure de calcium 0,7 μ mole
 Trioléine 0,98 μ mole (sous la forme de comprimé comme décrit ci-dessus).

On ajoute ces réactifs à 4,8 cm³ d'eau et on ajoute ensuite à la solution 0,20 cm³ d'échantillon contenant une quantité connue de lipase. Avec une agitation modérée, l'excipient dans le comprimé se dissout et une émulsion de trioléine est formée dans la solution aqueuse de réaction. A mesure que l'enzyme lipase contenu dans l'échantillon réagit avec l'émulsion de trioléine, des acides gras libres et des glycérides mélangés sont formés et le mélange devient de plus en plus optiquement transparent. La vitesse de "clarification" de l'émulsion de trioléine comme contrôlée à 340 nm se révèle être proportionnelle à l'activité de la lipase.

L'utilisation d'un comprimé décrit ci-dessus donne des émulsions très reproductibles et donne une stabilité de longue durée au substrat (au moins 12 mois).

Il va de soi que les modes de réalisation décrits ne sont que des exemples et l'on pourrait les modifier, notamment par substitution d'équivalents techniques, sans sortir pour cela du cadre de l'invention.

REVENDEICATIONS

1. Un procédé pour déterminer l'activité de la lipase d'un échantillon en faisant réagir l'échantillon avec une émulsion d'un triglycéride dans une solution aqueuse de réaction
5 et en mesurant la vitesse à laquelle le triglycéride est hydrolysé en fragments solubles, caractérisé en ce qu'on forme cette émulsion en préparant une matrice solide d'un excipient uniformément imprégné du triglycéride, cet excipient étant soluble dans la solution aqueuse de réaction, et en dissolvant la matrice solide
10 de manière à libérer le triglycéride dans la solution aqueuse de réaction.
2. Un procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le triglycéride comprend de la trioléine.
3. Un procédé selon la revendication 2, caractérisé
15 en ce que l'excipient comprend un sucre ou un alcool de sucre.
4. Un procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'excipient comprend un sucre ou un alcool de sucre choisis parmi le mannitol, l'inositol, le sorbitol, le maltose, le dextrose, le lactose, le dextrane, et les mélanges de ceux-ci.
- 20 5. Un procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'excipient comprend en outre du polyéthylène-glycol.
6. Un réactif utilisable dans une solution aqueuse de réaction pour déterminer l'activité de la lipase d'un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend une matrice solide d'un excipient
25 uniformément imprégnée d'un triglycéride, cet excipient étant soluble dans la solution aqueuse de réaction.
7. Un réactif selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'excipient comprend du polyéthylène-glycol et un sucre ou un alcool de sucre choisi parmi le mannitol, l'inositol, le
30 sorbitol, le maltose, le dextrose, le lactose, le dextrane, et les mélanges de ceux-ci.
8. Un réactif selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que le triglycéride comprend de la trioléine.
9. Un procédé de préparation d'un réactif utilisable
35 conjointement avec une solution aqueuse de réaction pour déterminer l'activité de la lipase d'un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes qui consistent à :
- (a) former une solution liquide d'au moins un triglycéride avec un solvant pour ce triglycéride;

(b) mélanger cette solution liquide avec une quantité prédéterminée d'un excipient qui est soluble dans la solution aqueuse de réaction, le volume de solvant utilisé pour former cette solution liquide étant choisi de manière à substantiellement saturer l'excipient; et

(c) évaporer le solvant pour laisser une matrice solide de l'excipient imprégnée du triglycéride, la quantité de triglycéride utilisée pour former la solution liquide étant choisie de manière à donner la concentration désirée de triglycéride par rapport au poids de matrice solide.

10 10. Un procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le triglycéride comprend de la trioléine.

11. Un procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le solvant comprend du chloroforme.

15 12. Un procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le solvant comprend un mélange de chloroforme et d'éthanol.

13. Un procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'excipient comprend un sucre ou un alcool de sucre.

20 14. Un procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'excipient comprend un sucre ou un alcool de sucre choisis parmi le mannitol, l'inositol, le sorbitol, le maltose, le dextrose, le lactose, le dextrane, et les mélanges de ceux-ci.

25 15. Un procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'excipient comprend en outre du polyéthylène-glycol.

16. Un procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que, dans l'étape (a) le triglycéride est de la trioléine et le solvant est du chloroforme; dans l'étape (b), l'excipient
30 comprend du polyéthylène-glycol et un sucre ou un alcool de sucre choisis parmi le mannitol, l'inositol, le sorbitol, le maltose, le dextrose, le lactose, le dextrane et les mélanges de ceux-ci.

17. Un procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 16, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape
35 consistant à mettre sous la forme de comprimés la matrice solide d'excipient imprégné de trioléine.